استخدام البروبولس كمحور مناعي فى الارانب

د.مهدى حسين محيل العمار
جامعة الكوفة\كلية العلوم /قسم علوم الحياة

الخلاصة:

جرى فى هذة الدراسة فصل وتنقية مستخلص البروبولس (Propolis) ودراسة الاثر المحور فى الاستجابة المناعية فى حيوان المختبر . كذلك تم تقدير نسبة البروتين فى البروبولس حيث شكل نسبة 18.60 ملغم/مل. بعد ذلك تم دراسة اثر البوبوليس المناعى المحور فى الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية وشمل التحوير تحديد الجرعة الفعالة لحدوث التحوير المناعى .

حيث تم تجريع الارانب بتركيز 10 ملغم/مل والتى اعطيت نتائج جيدة تم اعتمادها فى دراسة الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية .

كذلك تم دراسة عيار الضد المتخصص بدلالة مستضد بروتوبلازم الخلايا المنقى من البكتيريا *S. typhi* كما جرى اختبار التحوير المناعى الخلوى بواسطة اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض واختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتاخرة . وبينت نتائج الدراسة ان مستخلص البروبولس ذو كفاءة عالية فى تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية .

- المقدمة:-

يعتبر الجهاز المناعي في الانسان من الوسائل الدفاعية المهمة تجاه الممرضات الميكروبية التي تحث الاستجابة المناعية بنوعيها الخلطية والخلوية وكما تقوم بعض الخلايا المناعية بافراز السايتوكينات الالتهابية بفعل التحفيز من بعض المستضدات وخاصة IL-1 ،IL2 (Roitt ,1992).

بالاضافة الى ذلك تقوم بعض المستضدات بحث الخلايا المناعية لتوليد استجابة مناعية و للبعض الاخر منهاا القابلية على التحوير المناعي الذى يرفع الاستجابة المناعية او يخفضها .

ومن اهم المحورات المناعية هوالبروبولس قيد الدراسة الذى يحتوي على بعض البروتينات والسكريات حيث يتكون من 50% راتنج و30% شمع و10% زيوت طيارة و 5% حبوب لقاح مع5 % عناصر كيمياوية مثل (Mg,Ni,Ca ,Zn ,Fe) ذات الاثر المناعي(Castaldo &Capasso 2002).

ويحتوى ايضا على بعض المركبات الثانوية الاخرى المتمثلة با الفلافونات Flavonoides مثل Querstin, Galangin ,Pinobanksin and Caffic acid والتى تمتلك القابلية على تحفيز الجهاز المناعى على انتاج الاضداد (Banskota,*et al* 2001;Dimov ,2005).

و تتالف المكونات الحياتية للبروبولس من مشتقات نحل العسل مع ما يجمع من قلف وبراعم النباتات على شكل مضغة تغطي بها الشقوق الخشبية وحماية خلية النحل من الظروف الخارجية غير الملائمة و تعتبر مادة حافظة لها القابلية على تثبيط نمو العديد من الجراثيم .

استخدم البروبولس في دراسات مناعية عديدة حيث ذكر (Dimov *etal* (1991 بان البروبولس يستخدم كمحور مناعي ضد الممرضات ويزيد من كفاءة الخلايا البلعمية اعتمادا على مكوناتة والتى تختلف حسب المنطقة الجغرافية والمصدر النباتى بالاضافة الى موسم جمع المادة(Banskota,*et al* 2001).

كما اكد Bankove *etal* (2005) بان البروبولس يمتلك الفعالية الوقائية ضد الممرضات السالبة لصبغة كرام وكذلك استخدامة كمساعد مناعي وخاصة مستخلص البروبولس الذائب. واشارت الدراسة التي اجراها Ivanovaska *etal* ,(1995) الذى برهن على قدرة Cinnamic acid للبروبولس في تحفيز انتاج الخلايا اللمفية وتحرر السايتوكينات عند اصابة الفئران بـ *Klibeslla*.

ان عملية التحوير المناعي قد تحدث عن متغيرات مناعية في الجهاز المناعي او بواسطة عوامل خارجية حيث ان تنشيط الاستجابة المناعية او تحفيزها قد يكون مفيدا او ضارا لذا يجب ان يكون التحوير المناعي مرغوبا فيه ومنع حدوث التاثيرات السلبية التي تؤدي الى الهلاك (Bellanti,1985).

ان مستخلص البروبولس يحتوي على بروتينات مرتبطة بالكاربوهيدرات التي تمتلك القدرة على تلزن الخلايا الدموية للانسان والحيوان وكذلك يمتلك القدرة على تحفيز الخلايا على الانقسام وخاصة الخلايا اللمفاوية التائية والبائية. واوضح (Burrell, (1979 ان لة القابلية على تثبيط انتاج البروستاكلاندين وليكوترين وكذلك لة القدرة على التحفيز المناعى من خلال التاثير على الماكروفيج خارج الجسم الحى بالاضافة الى زيادة نسبة CD4/ CD8 فى الفئران (Bankota *et al* ,2001) .

كما واشار كل من Roth and Flaming,(1990) الى ان عدد من العوامل التي توضح مفهوم التحوير المناعي كدراسة الاسس الخلوية والجزئية الخاصة بالكبح المناعي من اجل الاستخدام الامثل للمحورات المناعية

ومعرفة التاثيرات الفسلجية للمثبطات المناعية المستخدمة في التحوير المناعي مع معرفة الالية التي تعمل بها هذه المواد حيث ان بعضها يعمل بصفة محور مناعي مضخم الاستجابة المناعية وبعضها الاخر يكون مثبطا لتلك الاستجابة وان الهدف من التحوير المناعي هو تغير الوظائف المناعية بشكل افضل للمضيف لذا يتطلب معرفة الفترة الزمنية المناسبة وتركيز الجرعة المؤثرة اللازمة لحدوث التحوير المناعي .

ان الهدف من الدراسة الاثر المحور للبروبولس بوصفها محورات مناعية لكل من المناعة الخلوية والخلطية في الارانب وعلى صعيد الاستجابة الاولية والثانوية.

- المواد وطرائق العمل :-

- فصل محاليل البروبولس:-

تم فصل وتنقية محلول البروبولس حيث اخذ غرام واحد من المادة واضيف اليها 15مل من المحلول الفسلجي ،تم رج الانبوبة باستخدام الرج الكهربائي ثم حفظت بالثلاجة (4C) لمدة يوم واحد ووضعت الانبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة /دقيقة ولمدة 10 دقائق ثم نقل 5 مل من المحلول الى انبوبة اخرى واضيف اليها حجم مساوي من

محلول سلفات الامونيوم بتركيز 40% ووضعت الانبوبة في الثلاجة لمدة ساعة واحدة ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة اهمل الراشح واذيب الراسب في 0.5 مل من المحلول الفسلجي . (Mitscher *et al*., 1992)

- تقدير نوع السكر في البروبولس

يستدل على وجود السكريات فى البروبولس حسب الطريقة المتبعة من قبل (1951) , Shihata

- تقدير تركيز البروتين الكلي في البروبولس.

استعملت طريقة البايوريت لقياس تركيز البروتين الكلي للبروبولس (Bishop *etal*,1985) .

- الدراسة المناعية :-

- حيوانات المختبر :- تم استعمال الارانب المحلية ذات اوزان تتراوح بين (500-1000 g) لدراسة اثر المحور المناعي (البروبولس) في الحيوان.

- تحضير راشح بروتوبلازم الخلايا:

تم الحصول على الراشح البكتيرى من *S typhi* باستخدام جهاز Sonicater الواردة فى (Al. Ammar ,2006)

- تحديد جرعة البروبولس لدراسة الاثر المناعي المناعية :-

استخدمت (الأرانب) في الدراسة المناعية حيث قسمت الحيوانات الى اربع مجاميع وجرعت الحيوانات المختبرية بجرع مختلفة (5, 10، 20 ملغم/مل) وبجرعتين متتاليتين وعلى مدى يومين ولم تظهر الجرعة الثانية اى تأثيرات سمية للحيوانات المختبرية لذا اعتمدت في دراسة الاثر المحور المناعي البروبولس جدول-1.

جدول (1) الجرعات المستخدمة في تجريع الحيوانات

Conc.mg\ml	Animals No.	Death rate
20mg\ml	3	1 - Death
10mg \ml	3	No Death
5mg\ml	3	No death
control	1	No death

Death= D

- تحديد الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية: تم استخدام منوال متعدد الحقنات Multiinjection Protocol في هذه التجربة وبعد اسبوع من انتهاء مدة التجريع (Bhatia & Ichhpujani, 1994)

- جمع الامصال:- Serum collection

بعد الانتهاء من عملية التمنيع تجمع الامصال من الحيوانات المعاملة وذلك بسحب الدم مباشرة Heart Punctureووضعت في انابيب معقمة ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي 2500دورة/دقيقة وفصل المصل بواسطة ماصة باستور معقمة وحفظت لحين الاستعمال.

- تحضير عالق كريات الدم الحمر المغطاة لمستضدالبروتوبلازم: تم تحضير عالق كريات الدم الحمر المغطاة لمستضدالبروتوبلازم حسب طريقة (1977) Garvey, *etal*, .

- تحديد عامل هجرة الخلايا البيض MIF: اتبعت طريقة (1969) Sobreg, لتحديد عامل تثبيط هجرة الخلايا البيضLIF في دم الارانب .

- اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتاخر:وحقنت الحيوانات ب0.1 مل من بروتوبلازم الخلايا بالأدمة لدراسة تفاعل فرط الحساسية المتاخر (Burrell,1979).

- النتائج

- الاستجابة المناعية الخلطية

جرى تجريع كل من حيوانات السيطرة وحيوانات المعاملة لمستضد البروتوبلازم الخلايا المنقى من بكتريا *S typhi* ثم خمس جرع بروبولس فموية بمعدل mg \ 5ml وجرى جمع عينات دم حيوانات السيطرة خلال فترات التجريع وكانت عيارات الضد المستخلص البروتوبلازم الخلايا 32,16,64,32 على التوالي اما الحيوانات التي جرعت بمستخلص البروبولس كانت عيارات الضد 32,32,128,64 على التوالي وهذا يعني ان البروبولس حفز على زيادة عيارات الضد جدول رقم (3).

جدول (3) الاثر المحور لاستجابة المناعة الخلطية للبروبولس

Immunogen type	Ab -Titer			
Time	Days 6	9	12	15
Protoplasim	32	64	16	32
Propolis	64	128	32	32

-الاستجابة المناعية الخلوية :-

جرى تمنيع الحيوانات في الاستجابة المناعية الخلوية حيث جرعت مجموعة السيطرة مع مجموعة الاختبار لمستضد البروتوبلازم الخلايا 0.1ml ثم جرعت بالبروبولس بتركيز 10 ملغم/مل ولخمس جرع جمع الدم في الايام18,15,12,9,6,3 مع مانع التجلط لدراسة LIF واختبار الجلد عن طريق الحقن تحت الادمة. كانت تفاعلات فرط الحساسية المتاخرة من البروتوبلازم الخلايا هو ظهور التفاعلات بعد hr 6-72 مثل،Erythema, In duration, and Necrosis مقارنة بمحموعة السيطرة جدول -.

جدول (4) تفاعلات فرط الحساسية المتاخر

Necrosis	Indurations	Erythema	Group
Occurring with 72 hr	Positive reaction at 24-48 hr with 12mm diameter	Positive reaction At 6-18 hr	R1
Occurring at 72 hr	Positive reaction at 24-48 hr with 13mm diameter	Positive reaction At 6-18 hr	R2
-	-	-	Control

وكان معامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في السيطرة 0.93 ,0.98, .93 , 0.98 ,0.98 ,0.85 في حين كانت معاملات التثبيط بوجود البروبولس 0.31,0.30,0.35,0.36.,0.38, 0.45 لفترة 6 ايام على التوالي جدول رقم (5).

جدول (5)عامل تثبيط الخلايا البيض للبروبولس في الاستجابة المناعية الخلوية

Group	LIF Ratio					
Time	3	6	9	12	15	18
Control	0.93	0.98	0.93	0.98	0.98	0.85
Propolis	0,45	0.38	0.36	0.35	0.30	0.31

						extract

-المناقشة:-

* تقدير كمية البروتين فى مستخلص البروبولس

جرى تقدير البروتين فى مستخلص البروبولس بواسطة طريقة القياس اللونى ، حيث ان تفاعل بايوريت يعد من التفاعلات المتخصصة للمركبات الحاوية على اواصر ببتيدية متعددة كالمركبات البروتينية . (1985 (Bishop *et al*, .

وقد اظهرت الدراسة ان مستخلصات البروبولس احتوت على وجود بروتين سكرى بتراكيز مختلفة وبلغت نسبة البروتين الكلى فى مستخلص البروبولس 18.60 ملغ / مل وهذا يدلل على استجابة المستخلص لفحص البايوريت.

- دور البروتوبلازم الخلايا: يمتلك البروتوبلازم الخلايا المعزول من *S typhi* عالى القدرة التمنيعية وعالى القدرة المستضدية وتنبية Th2 لانتاج اضداد متخصصة ذات صفة وقائية عالية كذلك لة دور منظم للاستجابة المناعية (Parslow *et al* 2001; Roitt *et al* 1990).

يتصف البروتوبلازم بانة مستضد القابلية على تنبية Th1 والتى تثمل Ts,Tdh المشاركة فى المناعة الخلوية لمستضد للتيفوئيد واختبار الجلد ، ويعتبر اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتاخر احد معايير قياس نشاط المناعة الخلوية للعائل . و عند حقن البروتوبلازم الخلايا فى ادمة الجلد يلاحظ تفاعل جلدى(احمرار) فى منطقة الحقن خلال 10 -8 ساعات من الحقن كذلك يسبب فى ارتشاح الخلايا اللمفاوية والبلعمية الكبيرة وعدد من الخلايا البيض الحبيبية فى موقع الالتهاب بعد مرور 48- 24 ساعة من الحقن حيث يتميز التفاعل باحمرار و تثخن ثم تنخر المنطقة المحقونة (Weir ,1992; Roitt and Rabason ,.2000)

- اثر البروبولس فى الستجابة المناعية الخلطية

جرى التحرى عن الاثر المحور لمستخلص البروبولس فى الاستجابة المناعية الخلطية من خلال التغيرات الحاصلة فى الاستجابة المناعية من خلال الارتفاع والانخفاض فى عيارات الضد الموجودة فى المصل الماخوذ من الحيوان المختبرى ، وثم تحديد عيار الضد المتخصص البروتوبلازم الخلايا بواسطة التلازن الدموى المنفعل كما وجد بان مستخلص البروبولس يحفز الاستجابة المناعية الخلطية من خلال تحفيز الخلايا الذاكرة المناعية البائية الذى يؤدى الى زيادة فى انتاج الاضداد(Goldsby,*et al*, 2000).

- اثر البروبولس فى الستجابة المناعية الخلوية : بخصوص تفاعل الجلد فان الاثر المناعى المحور للبروبولس كان اثرة محفزا لتفاعل الجلد فى الاستجابة المناعية وهذا يعتمد على الفترة الزمنية والجرعة المعطاة وجاءت هذة الدراسة متوافقة مع ما اشار اليه (1983), Clark حيث ذكر ان تفاعلات فرط الحساسية المتاخرة البروتوبلازم الخلايا يؤدى الى حدوث صدمة بعد 8-5 ساعات من حقن المستضد ويصل الى قمتة بعد مرور 24ساعة . ومن العوامل المؤثرة على التفاعل هي جرعة الارجين ونوعيتة وطريقة الحقن ، مع العوامل الاخرى المتمثلة بالهرمونات المحفزة ودرجة تحسس المستلم للعوامل الموضعية وبعض الادوية والمواد الكيمياوية2000, Roitt and *Rabason*

تم دراسة الاثر المناعى المحور للبروبولس الاستجابة المناعية الخلوية بواسطة عامل تثبيط الهجرة الخلوية LIF وكذلك اختبار الجلد المتوسط بفرط الحساسية المتاخرة . ويلاحظ من النتائج ان اثر البروبولس فى تثبيط الهجرة الخلوية كان محفزلعامل الهجرة فى الاستجابة الخلوية اى زيادة فى انتاج السايتوكينات التى تعمل على تثبيط الهجرة للخلابا البيض . وعند الاستمرار فى اعطاء الجرعات لاخرى يتحول التفاعل ايجابى فى انتاج السايتوكينات (Milssa *et al* 1998).

***Reference**

- **Al- Ammar**, Mahdi .H M.Some aspects of specific immune response of *S Typhi* on enteric fever patients and rabbits Ph.D. Thesis .Bibylon university.
- **Bankova** ,V,.(2005) .Chemical diversity of propolis and the problem of standardization . J, Ethanopharmacol. 100 :114- 117.
- **Banskota**, A.H;Tezuka, Y.;Kadota ,S.(2001) .Resent progress in pharmacological research of popropolis . Phytothe Res.15:561-571 .- Bishop,M.C ;Dben –Von Laufer , J.L.;Fody E.P. and thirty three contributors .(1985) Clinical chemistry principles, procedures and correlations. The Murray Printing company ,Philadelphia .
- **Bellanti** , J.A.(1985).Immunology III.W.B. Saanders company .USA.

- **Burrell** , R (1979) .Experimental immunology . 5th ed ,. PP:12-80 , Burgess Publishing company . USA .
- **Castaldo** ,S.;Capasso, F, (2002). Propolis, an old remedy used in modern medical .Fitoerapia. 73 (1) :S1-S6.
- **Clark** , W. R (1983).The experimental foundation of immunology , 2nd ed ., Academic Press , John Wiley and Sons, USA .
- **Dimov** ,V;Ivanovska ,N;Bankova ,V;and Popov,S 1992. Immunodulatory action of propolis. Bulgarian Academy of sciences V.10(12) P:817-823.
- **Dimov** ,V;;Bankova ,V;and Popov,S 2005. Immunodulatory action of propolis:Prophylactic activity against G- infectious and adjuvant effect of the water soluble derivative . Bulgarian Academy of sciences V.10(12) P:817-823. - - Ivanovska ,N;Neychev ,H; Bankova ,V, 1995.Influence of cinnamic acid (propolis) on lymphocyte proliferation cytokine release and klibsella infction in mice . Bulgarian Academy of sciences V.26(2) P:75-8.
- **Garvey** ,J .S .,N.E. Cremer and D.H. Sussdorf . (1977) . Method in immunology . 3 rd ed . P:518 -,356-359 . W.A. Benjamin ,Inc . Massachusetts .
- **Goldsby** , R.A.;Kindt ,T., J.Osborne ,B.A. (2000).Immunology ,4th ed ., W.H. Freeman and company , New York .
- **Milssa** ,S., Weisun , H., Blake ,P. and Lolis ,E .(1998) .Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor , EMBO J. 17 (13) :3534 -3541.
- **Parslow** ,I.G.; Stites ,D.P . and Terr ,A. I . (2000). Basic and clinical immunology . Prentice – Hall International , Inc ,London - Rajka , E.and S. Korossy . (1976) Immunological aspects of allergy and allergic diseases . 8:37 -47 , Plenum Press, Hungary.
- **Roitt** ,I. and Rabason , A. (2000). Really Essential Medical Immunology , Black Well Science Ltd .
- **Roth**,J.A. and Flaming , K. P. (1992) . Model systems to study immunodulation in domestic food animals , Aav .Vet .Sci. Com. Med. 35: 21-41 , Acadimic Press, Inc.
- **Shihata** ,I.M.(1951)Pharmacological study of (Analagis arvensis).M.D. Vet.Thesis, Cairo Univ,.
in - Soberg ,M. (1969).In vitro migration inhibition of peripheral blood leucocyte delayed type hypersensitivity .Acta . Medica .Sccand .
- **Weir** , D. M. (1992) . Immunology 6th ed ., Longman Singapore Publishers , Ltd ., Singapore

The action of propolis as immunodulatory in rabbits.

Dr. Mahdi Al- Ammar
University of Kufa -College of science
Dpt.of biology

Abstract:-

This study aimed to separate and purify the propolis extract and its imunodulatores effect on the immune response in rabbits.

The protein concentration of propolis was recorded as 18.60 mg /ml, the study has indicated the immunodulating effect of propolis on humoral and cellular

immune response .The immunodulator include the determination of useful dosage to achieve the immunodulator.

The rabbit was treated with concentration of 10 mg / ml which to lead to an encouraging result and it had been included to study the immunodulator effect for both responses .It has positive effect on humoral immunodulator effect by studying specific titer to purified protoplasmic antigen of *S typhi* , while the judge on cellular immunodulator accurse by leukocyte inhibition factor and skin test intermediate delay hypersensitivity .

The propolis extract had stimulatory effect for humoral and cellular immune response

.